

Opponensi bírálat

Tóth Attila: “A kapszaicin receptor (TRPV1) farmakológiája és keringésélettani szerepe”

MTA doktori értekezéséről

Megtiszteltetés számomra, hogy bírálója lehetek Tóth Attila MTA doktori értekezésének. Érdeklődéssel vettem kezembe a Debreceni Egyetem kiváló kutatójának munkáját, aki folytatván a szegedi és pécsi hagyományokat, kapszaicin-kutatásra adta a fejét. Az ember mindig örül, ha olyan értekezést bírálhat, amelynek témájában önmaga is dolgozik. Jómagam is három évtizede foglalkozom azokkal a neurofarmakológiai, immunfarmakológiai mechanizmusokkal, amelyek kutatásához a paprika csípős anyaga szolgált farmakológiai eszközként.

A disszertáció témája a kapszaicin receptor, mely szerkezete (TRP) és a hozzá kapcsolódó ligandok kémiai struktúrája (vanilloid) alapján jelenleg a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) nevet kapta.

Formai szempontok:

A disszertáció szerkezete:

130 oldal, ebből 30 oldal bevezetés, 5 oldal módszertan, 62 oldal az eredmények ismertetése, 33 oldal az új eredmények összefoglalása, diszkusszió, az eredmények potenciális hasznosítása fejezet.

A dolgozatban 98 ábra található, korrekt, részletes aláírásokkal, ami nagyban megkönnyíti a bíráló munkáját.

Az értekezést megalapozó eredeti közlemények száma: 25, kumulatív impakt faktoruk 91, Ebből a jelölt 4 közleményben első, 3 közleményben utolsó szerző. További egy összefoglaló közleményben első szerző.

A formai bontást, az egyes fejezetek terjedelmét megfelelőnek találom. Szinte minden oldalon van ábra, az ábrák jól illeszkednek a szövegbe, segítik a megértést. Néhány ábra azonban nehezen, vagy nem olvasható, nagyon kicsik a feliratok. A dolgozat nagy része az eredmények ismertetése. A megbeszélés fejezet ugyan rövid, de jól kiemeli és az irodalmi adatokkal összehasonlítva világossá teszi az olvasó számára, mik is a szerző originális, új eredményei a szakterületen.

Kérdések, megjegyzések az egyes fejezetekhez:

Bevezetés:

15. o.

Egy megjegyzés a kapszaicin-érzékeny neuronok hármaskörű funkciójával kapcsolatban: A kapszaicin-érzékeny neuronok szerepe nocicepcióban és a neurogén gyulladásban tankönyvi szinten ismert, mint ahogy ezt az 4. ábra is mutatja. A harmadik funkció leírása, vagyis, hogy gyulladásgátló anyagok is felszabadulnak az aktivált szenzoros idegvégződésből és a keringésbe jutva szisztémás hatást fejtenek ki a PTE Farmakológiai Intézet kutatócsoportjának a nevéhez fűződik. 1988-ban közölték először, hogy átmetszett lumbosakrális hátsó gyökök antidrómos elektromos ingerlésével gyulladásgátló mediátorok kerülnek a keringésbe (*Pintér és Szolcsányi, Agents and Actions 1988.*), majd azt is bizonyították, hogy a gyulladásgátló mediátorok a kapszaicin-érzékeny idegvégződésekből szabadulnak fel (*Pintér és Szolcsányi, Neurosci. Lett. 1996*). A szomatosztatin lehetséges szerepét írták le 1998-ban, amely alapja lehetett egy új gyógyszerfejlesztési iránynak, a szomatosztatin receptoron ható fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő szerek kutatásának.

20. o.

A szerző említi a resolvinokat, mint a TRPV1 receptor endogén antagonistáit. **Kérdésem: mit tud ezekről az anyagokról a legújabb irodalmi adatok szerint? Milyen gyógyszerfejlesztési konzekvenciái lehetnek ezeknek a kutatásoknak?**

30-31. o.

A 14, 15-ös ábra nehezen olvasható, nagyon kicsik a feliratok.

33. o.

A vaszkuláris TRPV1 vizsgálathoz patkány musculus gracilisből származó arteriola szakaszt metszettek ki. Miért választották ezt a kísérleti objektumot? A módszerek fejezetben csak a patkányér izolálást írja le, az eredmények fejezetben viszont vannak kutya koronária illetve, egér adatok. Egerekből hogyan nyerték az ereket? Milyen technika nehézség adódik egér erek izolálása esetén?

35.o.

A „6 well plét” helyett szerencsésebbnek tartanám a „6 lyukú lemez” kifejezést.

37.o.

A [3 H]-RTX – TRPV1 kötődési kísérleteket patkány gerincvelői preparátumon végeztek. A kimetszett gerincvelőt homogenizálták. Miért ezt a preparátumot használták? A TRPV1 receptorok nagy számban helyezkednek el a hátsógyöki ganglionokban. A gerincvelő kimetszése esetén a DRG-k is benne voltak a preparátumban?

Eredmények:

56.o.

A 34. ábrán olyan kicsik a betűk, hogy egyáltalán nem olvasható.

77.o.

A szerző leírja, hogy a nyúl TRPV receptor kapszaicinre érzéketlen, amiatt, hogy az 505-550 közötti aminosavaknak eltér a sorrendje. Kísérleteiket transzfektált sejtvonalakon végezték. Egy 2012-ben megjelent közlemény (Mol. Biol. Rep.39: 7583-7589) cáfolja, ezeket az eredményeket, vagyis kimutatták, hogy nyúl TRPV1 receptor aktiválható kapszaicinnel. Hogyan magyarázza a szerző ezeket az eltéréseket?

84. o.

A szerző kiemeli, hogy a CHO-TRPV sejtekben kimutathatók intracelluláris TRPV1 receptorok, melyeknek szerepe van az intracelluláris Ca raktárak szabályozásában. Ilyen receptorok a neuronokban nincsenek. Mit tud a szerző egyéb, nem neurális sejtekben levő intracelluláris TRPV1 receptorokról? Mi lehet ezek funkcionális jelentősége?

A 62. ábra alig olvasható.

Megbeszélés:

A kapszaicint a tankönyvek definíciója szerint, mint a szenzoros neuronokon szelektíven ható neurotoxint ismerjük. Jancsó Miklós, majd Szolcsányi János kutatásából kiindulva vált a szenzoros farmakológia fontos eszközévé. A kapszaicinnel, vagy reziniferatoxinnal való szisztémás előkezelés, alkalmas módszer a neurális TRPV1 receptorok deszenzibilizálására. Csak a 2000-es évek elején írták le, hogy TRPV1 receptorok kimutathatók a nem neurális sejteken, pl. keratinocitákon, fibroblasztokon, immunsejteken, simaizom sejteken, ami miatt felmerült a kérdés: nevezhető-e a kapszaicin továbbra is szelektív neurotoxinnak. Az első eredmények immunhisztokémiai módszerekkel születtek, ezért sokan szkeptikusak voltak

létezésükben. A receptor mRNS-ének kimutatása a perifériás szövetekben bizonyította a nem neurális expressziót. Tóth Attila még nem publikált, vaszkuláris TRPV1 receptorokra eredményeivel egyetértésben Kun és munkatársai 2012-ben leírták (*Kun et al. J. Mol. Neurosci*), hogy a szisztémás RTX előkezelés, illetve a láb denerválása nem befolyásolja a nem-neurális TRPV1 receptor mRNS szintet a talpi és lábháti bőrben patkányban. Igaz maradt tehát az az axióma, hogy a kapszaicin szelektív neurotoxin. Az *in vivo* alkalmazott dózisok szelektíven deszenzibilizálják a neurális receptorokat, nem hatnak a nem neurális populációra. A nem neurális TRPV1 receptorok szerepének kutatása jelenleg is „hot topic” a kutatási területen. **Tóth Attila munkacsoportjának nemzetközi szinten elismert érdemei vannak a vaszkuláris TRPV1 receptorok funkciójának, fiziológiai szerepének felderítésében.** Valóban, a receptoron ható, reményeink szerint fájdalomcsillapító hatással rendelkező gyógyszerjelölt molekulák fejlesztésének újabb problémája lehet, hogy számolni kell a nem-neurális TRPV1-en létrejövő farmakológiai hatásokkal is.

Hogyan illeszthetők bele a Kun és munkatársai által közölt adatok a dolgozat 128. oldalán említett, vaszkuláris receptorokra vonatkozó, még nem publikált eredményekbe? Esetleg a disszertáció beadása óta közölték-e ezeket az adatokat?

Mit tud a jelölt az általa vizsgált TRPV1 ligandok kutatásának későbbi fázisairól? Az általa vizsgált vegyületek közül került-e valamelyik preklinikai, esetleg klinikai fázisba? Mik voltak a gyógyszerjelöltek elbukásának leggyakoribb okai?

A vaszkuláris TRPV1 receptoron ható szelektív ligandok kutatása egyelőre futurisztikusnak tűnik a gyógyszerfejlesztésben. Tud-e a jelölt erre irányuló erőfeszítésekről?

Összefoglalás:

A szerző publikációi és a rendelkezésemre bocsátott akadémiai doktori disszertáció alapján **Tóth Attila munkásságának új eredményeit a következőkben foglalom össze:**

1. A TRPV1-en ható agonista és antagonist ligandok molekuláris farmakológiai fejlesztése során pikomoláláris nagyságrendben ható vegyületeket írtak le. Kimutatták, hogy a vanilloidokban található fenolos hidroxil csoport helyettesítése metánszulfonamid csoporttal metabolikusan stabilabb antagonist vegyületeket hoz létre. Az ultrapotens TRPV1 analóg a reziniferatoxin szerkezetének egyszerűsítésével molekula templátokat is fejlesztettek. Tóth Attila a TRPV 1 receptor ligandok

kutatására irányuló munkáját az Egyesült Államokban, az NIH-ben, Peter Blumberg laboratóriumában végezte, egy nagy munkacsoport tagjaként. Ez a munka nagy kitartást és szorgalmat igényel, és a sokszerzős cikkek magas kumulatív impakt faktort eredményeznek, azonban a kutatói kreativitás kielésére nem igazán van mód.

2. Tóth Attila 2003-ban tért vissza Magyarországra, ahol saját laboratórium építésébe kezdett, melynek eredményeit a disszertáció második fele tartalmazza. A jelölt magyarországi munkásságának „termése” a vaszkuláris TRPV1 receptorok kimutatása a vaszkuláris simaizom sejteken, funkcionális jelentőségük, fiziológiai szerepük tisztázása. Tóth Attila munkacsoportja kimutatta, hogy a TRPV1 receptor az arteriális simaizomsejtben expresszálódik és aktivációja vazokonstrikcióhoz vezet. Ezt a tényt TRPV1 knock-out egerek és izolált sejtek vizsgálatával is megerősítették. Kimutatták, hogy az arteriális simaizomban expresszálódó TRPV1 receptorok farmakológiai tulajdonságai eltérnek az érző neuronokban expresszált receptoroktól. Feltehetőleg a TRPV1 szövetspecifikusan vesz részt a vérkeringés szabályozásában. A bőrben a neurális TRPV1 elsősorban dilatatív hatásokat közvetít, mivel ott számos kapszaicin-érzékeny idegvégződés van az erek körül. A neurális TRPV1 receptorok izgatása révén vazoaktív neuropeptidek, elsősorban P-anyag és CGRP szabadul fel, melyek értágító hatással bírnak. A vázizom ereinek simaizom sejtjein nem neurális TRPV1 receptorok vannak, melyek aktiválódása közvetlen vazokonstrikciót eredményez.

Vélemény:

Tóth Attila tudományos munkásságát, közölt publikációit, a rendelkezésemre bocsátott doktori mű és annak összefoglalója alapján javaslom a nyilvános vita kitűzését és a mű elfogadását. Megállapítom, hogy a mű hiteles adatokat tartalmaz, a jelölt Ph.D. fokozatának megszerzése óta jelentős eredményekkel gyarapította a tudomány szakot.

Pécs, 2014. március 3.

Dr. Pintér Erika
egyetemi tanár
az MTA doktora